

19 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

12 Offenlegungsschrift  
11 DE 40 11 428 A 1

21 Aktenzeichen: P 40 11 428.7  
22 Anmeldetag: 9. 4. 90  
43 Offenlegungstag: 29. 11. 90

51 Int. Cl. 5:  
G 01 N 27/416  
G 01 N 27/49  
G 01 N 27/327  
G 01 N 35/00  
G 01 N 33/50  
C 12 Q 1/34  
C 12 Q 1/54  
C 12 Q 1/58  
// C12N 11/08

DE 40 11 428 A 1

30 Unionspriorität: 32 33 31  
24.05.89 DD WP G 01 N/328845

71 Anmelder:  
VEB Pharma Neubrandenburg, DDR 2000  
Neubrandenburg, DD

72 Erfinder:  
Kühn, Manfred, Dr.; Dockhorn, Martin; Böttcher,  
Norbert, DDR 1115 Berlin, DD; Kagelmaker, Horst,  
DDR 1297 Zepernick, DD; Eckardt, Sabine, DDR 1281  
Schwanebeck, DD

BEST AVAILABLE COPY

54 Meßvorrichtung und Verfahren zur automatischen Bestimmung der Konzentration von Biokatalysatorsubstraten

Die Erfindung betrifft eine Meßvorrichtung und ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Substraten von Biokatalysatoren für die Anwendung in Chemie, Biochemie, Pharmazie, Medizin und im Umweltschutz.

Die rechnergestützte Meßvorrichtung besteht aus einem ein Biosensorsystem enthaltenden, kalibrierten Meßsystem, das über einen AD-Wandler mit einer ebenfalls über den Rechner gesteuerten Steuer- und Auswerteeinheit verbunden ist, einer Dateneingabeeinheit zum Dialog mit der Meßvorrichtung und einer Anzeigevorrichtung beziehungsweise einem Dokumentationsgerät zur Meßergebnisausgabe.

Mit dem Verfahren werden mittels der Meßvorrichtung Konzentrationen von Substraten der Biokatalysatoren in Gegenwart von die Meßergebnisse verfälschenden Störsubstanzen in Meßproben unterschiedlichster Herkunft schnell und mit guter Präzision bei Wegfall zeitaufwendiger, manueller Arbeitsschritte bestimmt.

DE 40 11 428 A 1

## Beschreibung

Die Erfindung betrifft eine Meßvorrichtung und ein Verfahren zur automatischen Konzentrationsbestimmung von Substraten biokatalytischer Reaktionen. Die Erfindung wird eingesetzt zur quantitativen Bestimmung solcher Substrate, die in Chemie, Biochemie, Biotechnologie, Pharmazie, Medizin und Umweltschutz Bedeutung besitzen.

Analysenverfahren zur quantitativen Bestimmung chemischer Substanzen unter Verwendung von biologisch aktiven Verbindungen als Analysereagenz sind aus der modernen Analytik nicht mehr wegzudenken. Von herausragender Bedeutung sind dabei Enzyme und in neuerer Zeit auch höher integrierte Systeme, wie z. B. Mikroorganismen. Als Reagentien in löslichen Analysensystemen werden diese Biokatalysatoren bzw. Biokatalysatorsysteme schon seit vielen Jahren angewendet. Dabei zeigt sich aber, daß in vielen Fällen Enzyme und Mikroorganismen trotz ihrer unbestreitbaren Vorteile, wie hoher Spezifität, in löslichen Analysensystemen wegen ihrer nur einmaligen Verwendbarkeit viel zu teure Reagentien sind, um eine breite und umfangreiche Anwendung zu finden. Deshalb wird auch seit vielen Jahren nach Analysenmethoden und Vorrichtungen gesucht, bei denen die teuren Biokatalysatoren mehrfach eingesetzt werden können. In den Biosensorsystemen hat man mit Sicherheit Vorrichtungen entwickelt, bei denen diese Forderungen erfüllt sind ("Biosensors: Fundamentals and Applications" Oxford Univ. Press, 1987, Ed. by A. P. F. Turner, I. Karube and G. S. Wilson).

Gegenwärtig besitzen unter den Biosensoren die Enzymelektroden die größte Bedeutung. In Enzymelektroden, bei denen die Biokatalysatorkomponente Enzym immobilisiert und damit wiederverwendbar ist, sind die Vorteile der elektrochemischen Transduktoren, wie hohe Sensitivität und schnelle Meßwertbereitstellung, mit den Vorteilen der Enzyme, wie hohe Spezifität, miteinander verbunden. Diese aufgeführten Vorteile von Enzymelektroden erklären auch ihren Entwicklungsvorsprung unter den Biosensortypen, was auch in der Bereitstellung kommerzieller Geräte auf der Basis von Enzymelektroden zum Ausdruck kommt (F. W. Scheller et al., Biosensors 2 (1985) 135—160). Insbesondere kommerzielle Vorrichtungen mit Enzymelektroden, die auf dem amperometrischen Meßprinzip beruhen, besitzen einen hohen Entwicklungsstand und werden in klinischen Einrichtungen und Biotechnologiezentren eingesetzt.

Unter den potentiometrischen Enzymelektroden mit immobilisierten Enzymen, die ionenselektive Elektroden als elektrochemische Transduktoren nutzen, sind jedoch bisher lediglich solche auf der Basis der teuren, gassensitiven Elektroden kommerziell erhältlich (F. W. Scheller et al., Biosensors 1 (1985) 135—160). Potentiometrische Enzymsensoren mit pH-Elektroden oder pH-sensitiven, ionenselektiven Feldeffekttransistoren als elektrochemische Transducerelemente dagegen haben bisher lediglich als grundlegende Neuentwicklung bzw. Labormuster Bedeutung erlangt, weil die auf der Basis dieser elektrochemischen Transduktoren entwickelten Enzymsensoren erhebliche Nachteile haben (Kirstein et al., Biosensors 1 (1985) 117—130), wie wechselnde Sensitivitäten beim Vermessen gepufferter Analytlösungen oder unerwünschte Einflußnahme der Ionenaktivität, insbesondere aber der Wasserstoffionenaktivität auf das Meßergebnis. Diese Einflußnahme sich ständig verändernder Analytlösungsparameter, wie pH-Wert oder

Pufferkapazität erlauben keine exakte Bestimmung der Analytkonzentration. Diese Probleme erklären auch das Fehlen von geeigneten Vorrichtungen und Geräten potentiometrischer Enzymsensoren mit pH-Elektroden und pH-ISFET's als Transducerelemente zur quantitativen, schnellen und effektiven Konzentrationsbestimmung der von erheblicher analytischer Bedeutung und im wesentlichen nur mit diesen Enzymsensortypen quantitativ zu bestimmenden chemischen Verbindungen, wie Harnstoff, Penicillin, Kreatinin, Lysin, Glutamat, Acetylcholin und Glutamin in biologischen Lösungen, wie z. B. Blut, Serum, Urin, Milch oder Fermentationslösungen. Aber auch die bei potentiometrischen Enzymsensorsystemen, bei denen lösliche Enzyme verwendet werden, vorgeschlagenen Lösungen sind auf potentiometrische Enzymsensorsysteme mit immobilisierten Enzymen nicht anwendbar. Sie beseitigen lediglich den Einfluß unterschiedlicher pH-Werte der Analytlösungen. Darüber hinaus erfordern sie einen erheblichen Geräteaufwand zur Dosierung exakter Mengen von Meß-, Analyt- und Enzymlösungen, wobei letztere nach jedem Meßvorgang wie bei den bisherigen traditionellen Analytbestimmungsmethoden mit löslichen Enzymen auch verworfen werden (M. Ripamonti, A. Mosca, E. Rovida et al., Clin. Chem. 1984, 30, 556—559).

Potentiometrische Biosensorsysteme mit immobilisierten Biokatalysatoren, wie sie in der Literatur beschrieben sind (R. B. Kobos in: Ion-selektive Electrodes in Anal. Chem., Plenum Press, New York and London, 1980, 1—84, Ed. by H. Freiser oder DD-WP 2 53 425 5) arbeiten auch lediglich nur in Meß- und Probenlösungen mit einheitlichen und vergleichbaren Eigenschaften zuverlässig und richtig bzw. vernachlässigen, wie im Falle des genannten Patentes, die die Meßergebnisse verfälschenden Einflüsse unterschiedlicher Pufferkapazitäten der Meßproben oder die unterschiedlichen Ansprechverhalten der elektrochemischen Transduktoren in diesen Zweielektrodensystemen.

Die als erhebliche Nachteile auftretenden Einflüsse von Störsubstanzen auf ein Meßergebnis traten aber nicht nur bei Biosensorsystemen auf, die auf dem potentiometrischen Meßprinzip beruhen. Man findet sie auch bei den weit verbreiteten und erhebliche Bedeutung besitzenden amperometrischen Biosensorsystemen. Diese Störeinflüsse auf das Meßergebnis bei amperometrischen Biosensorsystemen können bis zu einem gewissen Grade durch Immobilisierung zusätzlicher Anti-Interferenzschichten beseitigt werden, weil diese den Zutritt der Störsubstanzen bis zur die gewünschte biokatalytischen Reaktion katalysierenden Biokatalysatorschicht bzw. bis zum elektrochemischen Transduktor verhindern (R. Rennsberg, F. Schubert, F. Scheller, TIBS, 1986, 11, 216—220). Diese Vorgehensweise hat aber auch Nachteile, da zum einen schwierig herstellbare Multienzymmembranen verwendet werden müssen und zum anderen die abschirmende Wirkung der Anti-Interferenzschichten nur für vergleichsweise geringe Konzentrationen der Störsubstanzen wirksam sind. Diese Ausschlußkonzentrationen liegen z. B. bei Fermentationslösungen weit unter den Störsubstanzkonzentrationen, so daß die Anti-Interferenzschichten wegen der Überlastung bei hohen Störsubstanzkonzentrationen schnell unwirksam werden.

Das Ziel der Erfindung ist es, eine Meßvorrichtung und ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Biokatalysatorsubstraten zu entwickeln, wobei eine Verringerung manueller Arbeit wie Messen, Steuern und Auswerten bei gleichzeitiger Verbesserung von

Genauigkeit, Zuverlässigkeit und Schnelligkeit angestrebt wird.

Die Aufgabe der Erfindung besteht in der Entwicklung einer automatisch arbeitenden Meßapparatur mit Biosensoren und eines Verfahrens zur Bestimmung von Biokatalysatorsubstraten, mit der eine Verringerung der manuellen Arbeiten und eine effektive Bestimmung gewährleistet sind.

Die erfindungsgemäße Meßvorrichtung besteht aus einem kalibrierten, mittels eines programmierbaren Rechnersystems gesteuerten Meßsystem, das über einen Analog-Digital-Wandler mit einer Steuer- und Auswerteeinheit verbunden ist, einer Dateneingabeeinheit zu seiner Bedienung sowie einem Dokumentiergerät.

Das Meßsystem enthält als wesentlichen Bestandteil ein Biosensorsystem. Das Biosensorsystem ist in einer thermostatisierbaren Durchflußmeßzelle angeordnet und über seine elektrischen Leitungen und über den Analog-Digital-Wandler mit der Steuer- und Auswerteeinheit verbunden. Die Durchflußmeßzelle ist so konstruiert, daß in sie für einen Meßvorgang über eine Meßzufuhrleitung mit durch die Steuer- und Auswerteeinheit steuerbarem Ventil die Meßlösung mit Hilfe einer Dosierpumpe aus einem Vorratsbehälter dosiert wird. Die Meßlösung wird durch einen Rührer gleichmäßig durchmischt. Die Meßlösung ist auf eine Pufferkonzentration von 2 mol/l bis  $10^{-5}$  mol/l mit einem pH-Wert in der Nähe des pH-Optimums des jeweils immobilisierten Biokatalysators eingestellt. Nach einem Meßvorgang wird die Meßlösung mit Hilfe einer Absaugvorrichtung über eine Meßzellenabfuhrleitung mit durch die Steuer- und Auswerteeinheit steuerbarem, geöffnetem Ventil entfernt. Das Biosensorsystem enthält erfindungsgemäß mindestens drei elektrochemische Sensoren. Dabei dient der Analog-Digital-Wandler der Umwandlung der anfallenden Signale in die durch das Rechnersystem nur verarbeitbaren digitalen Signale. Ein Sensor ist in jedem Falle ein mit mindestens einem Biokatalysator beschichteter, elektrochemischer Sensor.

Mit einem Biokatalysator beschichtet bedeutet, daß Enzyme, Mikroorganismen, tierische, pflanzliche oder humane Zellen, Zellorganellen und andere biokatalytisch aktive Materialien, z. B. mit diesen Biokatalysatoren modifizierte Antikörper, Antigene, Haptene, Hormone oder Gemische der genannten Biokatalysatoren, auf den sensitiven Oberflächen des Sensors immobilisiert sind. Der zweite Sensor ist ebenfalls ein mit mindestens einem Biokatalysator beschichteter, elektrochemischer Sensor, er kann aber auch ein unbeschichteter, elektrochemischer Sensor sein, er muß aber von der gleichen Art wie der erste Sensor sein. Liegt dieser zweite Sensor jedoch in beschichteter Form vor, so ist auf der sensitiven Oberfläche dieses elektrochemischen Sensors mindestens ein Biokatalysator immobilisiert, der eine oder mehrere Störsubstanzen für den ersten Sensor umsetzt und damit bestimmen kann. Der dritte elektrochemische Sensor dient als Referenzsensor gegenüber den beiden anderen Sensoren. Er muß nicht in jedem Falle als dritter Sensor sichtbar im Biosensorsystem enthalten sein, da auch solche elektrochemischen Transduktoren für die Entwicklung des Biosensorsystems verwendet werden können, deren integraler und oft unsichtbarer Bestandteil dieser Referenzsensor ist. Sein Vorhandensein ist jedoch für das Funktionieren des Biosensorsystems eine unabdingbare Voraussetzung. Die elektrochemischen Transduktoren für die Sensoren können unterschiedlichster Art sein, so daß verschiedenartigste, durch die biokatalytische Reaktion

erzeugte, physikalische Meßgrößen durch die Meßvorrichtung quantitativ bestimmt werden können. Erfindungsgemäß werden für die Entwicklung der Meßsensoren des Biosensorsystems ionenselektive Sensoren, z. B. pH-Elektroden bzw. pH-sensitive, ionenselektive Feldeffekttransistoren oder Sauerstoffelektroden vom Typ der Clark-Elektroden bzw. wie diese gleiche Eigenschaften besitzende und mit Mediatoren modifizierte Elektroden oder Leitfähigkeitselektroden verwendet. Bei Biosensorsystemen zur Bestimmung von Biokatalysatorsubstraten wie Harnstoff, Penicillin, Kreatinin, Aminosäuren, Acylcholin, Peptiden oder einigen Sacchariden sind auf den pH-sensitiven Oberflächen der ionenselektiven Sensoren oder Leitfähigkeitselektroden des ersten Sensors solche Biokatalysatoren immobilisiert, bei deren biokatalytischer Wirkung nach Zugabe oben genannter Biokatalysatorsubstrate zur Meßlösung pH-Änderungen oder Änderungen anderer Ionenkonzentrationen auftreten. Solche Biokatalysatoren sind z. B. Enzyme wie Urease, Penicillinase, Penicillinacylase, Kreatininase, Deaminasen, Decarboxylasen, Proteasen und einige Kohlehydrate umzusetzenden Enzyme, z. B. Glukoseoxidase, aber auch höher integrierte biokatalytisch aktive Systeme wie Mikroorganismen, Zellen unterschiedlicher Herkunft, Zellorganellen, Organschnitte, die diese Enzymaktivitäten besitzen und mit diesen genannten Biokatalysatoren modifizierte Antikörper, Antigene, Haptene, Hormone und andere biologisch aktive Verbindungen. Biosensorsysteme mit auf diese beschriebene Weise beschichtetem ersten Sensor besitzen im allgemeinen einen unbeschichteten zweiten Sensor und einen Referenzsensor, wie er aus der Elektrochemie für pH-Werte messende Sensorsysteme bekannt ist. In einer anderen Variante ist das Biosensorsystem der Meßvorrichtung so aufgebaut, daß bei Verwendung von Sauerstoffkonzentration oder Konzentrationen seiner Reduktionsprodukte messenden Elektroden bzw. gleiche Eigenschaften besitzenden und mit elektrisch leitenden Verbindungen, den sogenannten Mediatoren, modifizierten Elektroden als Sensoren auf der sensitiven Oberfläche des ersten Sensors Biokatalysatoren immobilisiert sind, bei deren biokatalytischer Wirkung nach Zugabe ihrer Substrate zur Meßlösung Sauerstoff verbraucht oder gebildet wird. Zu diesen Biokatalysatoren zählt man die zu den Oxidoreduktasen gehörenden Enzyme, die in ihrer Vielfalt allein oder in Kombination mit Enzymen aus anderen Enzymklassen, besonders aus der Enzymklasse der Hydrolasen oder als Bestandteil der bereits genannten höher integrierten biokatalytisch aktiven Systeme oder als Teil modifizierter Antikörper, Antigene, Haptene, Hormone und anderer biologisch aktiver Verbindungen auf dem ersten Sensor immobilisiert sind. Ihre Immobilisierung gestattet die quantitative Bestimmung ihrer Substrate. Der zweite Sensor ist bei diesen Systemen auch mit einem Biokatalysator beschichtet. Bevorzugt sind diese immobilisierten Biokatalysatoren ein Enzym oder mehrere Enzyme, die eine mit dem ersten Sensor interferierende Störsubstanz umsetzen und damit deren quantitative Bestimmung erlauben. Weniger bevorzugt werden dafür höher integrierte, biokatalytisch aktive Systeme verwendet. Referenzsensor ist ebenfalls eine aus der elektrochemischen Analytik allgemein bekannte Referenzelektrode.

Ein zweites wesentliches Bauteil, das für die automatische Steuerung der Wechselwirkungen der mechanischen und elektronischen Elemente der Meßabläufe und für die Auswertung der Meßsignale zur Ergebnisbildung und -dokumentation verantwortlich ist, ist die

rechnergestützte Steuer- und Auswerteeinheit. Sie besteht aus

- einer Meßzeiteinrichtung, die so dimensioniert ist, daß die Meßzeiten des Biosensorsystems frei wählbar, bevorzugt aber von 2 Sekunden bis 60 Sekunden festgelegt sind,
- einer Zeitablaufsteuerung, die das Ende der programmierten Meßzeit nach Meßprobenzugabe zur und Meßprobenerkennung in der Meßlösung bestimmt,
- einer Meßablaufsteuerung, die den zeitlichen Ablauf aller Meß- und Kontrollvorgänge koordiniert,
- einem Probenerkennungssystem, das nach Meßprobenzugabe zur Meßlösung den Meßzeitbeginn auslöst,
- einer Kalibrier- und Meßvorgangssteuerung, die die Reihenfolge der Kalibrier-, Meß- und Kontrollvorgänge der Meßabläufe festlegt,
- einem Meßwertaufnahmesystem, das die Meßsignale von den Sensoren aufnimmt und ablegt,
- einer Vorrichtung zur Verarbeitung der Meßsignale und Ergebnisbildung,
- einem Zwischenspeicher für die Ergebnisse der Kalibrierung, der Kontrolle der Aktivitätszustände der Sensoren des Biosensorsystems und der zu programmierenden Meßzeiten,
- einem Erkennungssystem für den Aktivitätszustand der Sensoren des Biosensorsystems und
- einem Stromversorgungssystem für sämtliche Aggregate der Meßvorrichtung.

Essentieller Bestandteil der Kalibrier- und Meßvorgangssteuerung der Auswerte- und Steuereinheit sind Vorrichtungen und Systeme, die gewährleisten, daß vor der Konzentrationsbestimmung der Biokatalysatorsubstratkonzentration die Ermittlung der Korrekturfaktoren, die ein unterschiedliches Ansprechverhalten der Sensoren gegenüber auf das Biosensorsystem einwirkenden Störsubstanzen berücksichtigen und eine Kalibrierung mit einer definierten Biokatalysatorsubstratkonzentration, die in einem Kalibrierpuffer mit geeigneter Pufferkapazität aufgelöst ist, ermöglichen. Die Korrekturfaktoren für das Biosensorsystem werden ermittelt, indem Substrate oder Produkte der biokatalytischen Reaktion, die auf dem mit einem Biokatalysator beschichteten ersten Sensor abläuft, in dem Mengen und Konzentrationen zur Meßlösung addiert werden, daß etwa gleichgroße Meßsignale erhalten werden, wie sie bei der durch die Biokatalysatoren realisierten biokatalytischen Reaktion nach der Substratzugabe zur Meßlösung auftreten. Für den Kalibriervorgang ist die Kalibrier- und Meßvorgangssteuerung der Steuer- und Auswerteeinheit so ausgelegt, daß zur Kompensierung von Toleranzen des Meßsystems und von Änderungen der Aktivitätszustände der immobilisierten Biokatalysatoren des Biosensorsystems mit Biokatalysatorsubstratkonzentrationen kalibriert wird, die in Kalibrierpuffern aufgelöst sind, deren Pufferkapazitäten sich aus den Mittelwerten der unterschiedlichen Pufferkapazitäten der zu vermessenden Meßproben mit den unbekannten Biokatalysatorsubstratkonzentrationen ergeben, und die nach an sich bekannten Verfahren bestimmt werden. Nach den Kalibrier- und Meßvorgängen werden mit der Vorrichtung zur Meßwertverarbeitung die anfallenden Meßsignale in Meßergebnisse umgewandelt. Dabei wird mit Hilfe von in die Vorrichtung zur Meßwertver-

arbeitung integrierten Bauteilen die Differenz aus dem Meßsignal des ersten Sensors und dem Meßsignal des zweiten Sensors gebildet, die mit dem Korrekturfaktor multipliziert wird, dieser Wert mit dem Wert für die Kalibrierkonzentration verglichen wird und der Vergleichswert nach Umrechnung in Konzentrationseinheiten (oder Aktivitätseinheiten) der zu bestimmenden Biokatalysatorsubstrate als Meßergebnis ermittelt, das durch digitale Anzeige oder über einen Monitor oder Drucker dokumentiert wird. Erfindungsgemäß wird die Meßvorrichtung zur Bestimmung der Penicillinkonzentration in Fermentationslösungen eingesetzt. Es wird ein Biosensorsystem verwendet, das aus einer pH-Elektrode, die mit einem penicillinspaltenden Enzym beschichtet ist, einer unbeschichteten pH-Elektrode und einer Referenzelektrode besteht und in der Meßzelle angeordnet ist. Zur Kalibrierung des Meßsystems wird die zur Ermittlung des Korrekturfaktors erforderliche Konzentration einer Mineralsäure, vorzugsweise Salzsäure, und die Pufferkapazität für den Kalibrierpuffer nach an sich bekannten Verfahren vorher bestimmt.

Die Bestimmung der Penicillinkonzentration und die vorherige Kalibrierung mit der bestimmten Konzentration an Salzsäure ( $10^{-2}$  n HCl) und einer definierten Penicillinkonzentration (30 mM Penicillin G/l), Pufferkonzentration  $1 \times 10^{-2}$  mol/l —  $1 \times 10^{-4}$  mol/l, pH = 6,0–8,11, erfolgen automatisch durch die Meßablaufsteuerung mit Hilfe der Meßzeiteinrichtung, der Zeitablaufsteuerung des Probenerkennungssystems und der Kalibrier- und Meßvorgangssteuerung, nach der Probenzugabe zur Meßlösung. In Abhängigkeit vom mit penicillinspaltenden Enzym beschichteten Sensor liegt die Meßzeit unter 20 Sekunden.

Zur Bestimmung von Harnstoff in Serum wird erfindungsgemäß ein Biosensorsystem eingesetzt, das aus einer pH-Elektrode, die mit Urease beschichtet ist, aus einer zweiten unbeschichteten pH-Elektrode und einer Referenzelektrode besteht. Zur Ermittlung des Korrekturfaktors verwendet man eine Base, vorzugsweise 0,015 n Natronlauge. Die Kalibrierung erfolgt mit einer definierten Menge Harnstofflösung, vorzugsweise 10 mM Harnstoff/l, die Pufferkonzentration ist  $1 \times 10^{-3}$  mol/l bis  $5 \times 10^{-3}$  mol/l, der pH-Wert 6,8–7,4. Die Meßzeit liegt unter 30 Sekunden.

Die Bestimmung des Disaccharids Saccharose in Gegenwart von Glukose erfolgt mit einem Biosensorsystem, das aus einer mit einer Enzymmembran beschichteten Sauerstoff oder Reduktionsprodukte messende Elektrode besteht. In der Enzymmembran sind Saccharose (Invertase), Mutarotase und Glukoseoxidase enthalten. Die zweite Elektrode ist ebenfalls eine Sauerstoff- oder seine Reduktionsprodukte messende Elektrode, die mit Glukoseoxidase und gegebenenfalls Mutarotase beschichtet ist. Die dritte Elektrode ist eine Referenzelektrode. Der Korrekturfaktor wird mit einer definierten Menge Glukoselösung (10 mM Glukose/l) bestimmt, die Kalibrierung erfolgt mit einer Saccharoselösung (10 mM Saccharose), die Pufferkonzentration ist 2 mol/l und der pH-Wert 6,0 bis 7,5. Die Meßzeit liegt unter 30 Sekunden. Das erfindungsgemäße Verfahren zur Bestimmung des Disaccharids Laktose enthält in der Enzymmembran des ersten Sensors die Enzyme  $\beta$ -Galaktosidase, Mutarotase und Glukoseoxidase und in der Enzymmembran des zweiten Sensors Glukoseoxidase und gegebenenfalls Mutarotase, und die dritte Elektrode ist die Referenzelektrode. Der Korrekturfaktor wird mit einer definierten Menge Glukoselösung (10 mM Glukose/l) bestimmt, die Kalibrierung des Meßsystems

erfolgt mit einer definierten Menge Laktoselösung (10 mM Laktose), die Pufferkonzentration ist 2 mol/l bis  $1 \times 10^{-3}$  mol/l und der pH-Wert 6,0 bis 7,5.

Die Meßzeit liegt im Bereich von weniger als 30 Sekunden. Zur Bestimmung des Disaccharids Maltose nach dem erfindungsgemäßen Verfahren enthält die Enzymmembran des ersten Sensors Glukoamylase, Muta- 5 rotase und Glukoseoxidase und die Enzymmembran des zweiten Sensors Glukoseoxidase und gegebenenfalls Mutarotase. Die dritte Elektrode ist die Referenzelektrode. Der Korrekturfaktor wird auch hier mit einer definierten Menge Glukoselösung (10 mM Glukose/l) bestimmt, und die Kalibrierung des Meßsystems wird mit einer definierten Menge Maltoselösung (10 mM Maltose) vorgenommen, die Pufferkonzentration ist 2 mol/l bis  $1 \times 10^{-3}$  mol/l und der pH-Wert 6,0 bis 7,5.

Die Meßzeit zur Bestimmung einer Meßprobe beträgt weniger als 30 Sekunden.

Mit der erfindungsgemäßen Meßvorrichtung können eine Vielzahl von Biokatalysatorsubstraten schnell und in einfacher Weise quantitativ bestimmt werden. Durch die rechnergestützte, automatisierte Ablaufsteuerung werden noch häufig anzutreffende manuelle und zeit- 20 aufwendige Arbeitsschritte, die sich aus den Meß-, Steuer- und Auswertevorgängen bei Analysenverfahren ergeben, wesentlich verringert. Durch die Beseitigung von bei bisher vorhandenen Meßvorrichtungen auftretenden Fehlerquellen werden mit der erfindungsgemäßen Meßvorrichtung zusätzlich auch die Richtigkeit und Zu- 30 verlässigkeit der Analysenmethoden unter Verwendung von Biosensoren erheblich verbessert.

#### Beispiel 1

Die erfindungsgemäße Meßvorrichtung zur effektiven und automatischen Konzentrationsbestimmung von Biokatalysatorsubstraten wird nachfolgend anhand der durch sie verwirklichten Meßablauffolge beschrieben:

Fig. 1 stellt den prinzipiellen Aufbau der Meßvorrichtung dar und wird zur Darstellung der Meßabläufe herangezogen. Zur Bestimmung der Penicillinkonzentration in Fermentationslösungen wird das aus einer mit Penicillinase (EC 3.5.2.6.) beschichteten pH-Elektrode als Sensor (15) und einer unbeschichteten pH-Elektrode als Sensor (16) — beide Sensoren werden mit integrier- 45 tem Referenzsensor (17) verwendet — bestehende Biosensorsystem (7) in der Meßzelle (5) angeordnet. Als nächste vorbereitende Schritte zur Penicillinbestimmung in Fermentationslösungen werden die zur Ermittlung des Korrekturfaktors erforderliche Konzentration einer Mineralsäure und danach die geeignete Pufferkapazität für den Kalibrierpuffer durch Titration von Fermentationslösungen bestimmt. Alle weiteren Arbeitsschritte — ausgenommen die Dosiervorgänge, die nicht Gegenstand dieser erfindungsgemäßen Meßvorrichtung sind, aber durchaus in den automatischen Meßablauf integriert werden können — erfolgen mit Hilfe der Meßzeiteinrichtung (18), der Zeitablaufsteuerung (19), der Meßablaufsteuerung (20), des Probenerkennungssystems (21) und der Kalibrier- und Meßvorgangssteuerung (22) automatisch bzw. werden nach visuellen und über die rechnergestützte Steuer- und Auswerteeinheit (3) gesteuerten Anweisungen ausgeführt. Alle nachfolgend beschriebenen Meßschritte unterliegen einem programmierten Meßablauf, der gesteuert wird durch die Meßablaufsteuerung (20). Zu Beginn des Einsatzes der Meßvorrichtung wird die Meßlösung aus dem Vorratsbehälter (11) mit Hilfe der Dosierpumpe (10) bei 65

geöffnetem Ventil (9) und geschlossenem Ventil (13) über die Meßzellenzuflußleitung (8) in die Meßzelle (5) gepumpt, in die obiges Biosensorsystem (7) eintaucht. Nach Füllen der Meßzelle (5) mit der Meßlösung beginnt das Überprüfen des Grundzustandes der Meßsensoren (15) und (16). Bei nichtkonstanten Ausgangspotentialen der Meßsensoren (15) und (16) werden durch Befehle die Meßzelle geleert, wieder gefüllt und die Meßsensoren (15) und (16) damit so lange automatisch 10 aquilibriert, bis die Ausgangspotentiale konstant sind. Gelingt das mit fünf der beschriebenen Spülvorgänge nicht, so erfolgt per Befehl über die Meßvorrichtungsteile (27) oder (28) die Ausschrift "Sensorwechsel". Bei konstanten Ausgangspotentialen wird der Befehl "Eingabe der Meßzeit" gegeben, der über die Dateneingabeeinheit (4) ausgeführt wird. In Abhängigkeit vom Aktivitätszustand des mit Penicillinase beschichteten Sensors (15) liegt bei der Bestimmung von Penicillin in Fermentationslösungen die Meßzeit im Bereich von zwei bis fünf Sekunden und ist in diesem Bereich über die Dateneingabeeinheit (4) der Meßzeiteinrichtung (18) der Steuer- und Auswerteeinheit (3) auch mitzuteilen, in der sie für die nachfolgenden Meßvorgänge abgespeichert wird. Als nächster Meßvorgangsschritt erfolgt die Bestimmung des Korrekturfaktors für das Biosensorsystem (7). Zu diesem Zweck werden nach Befehlserteilung 50 µl einer  $10^{-2}$ -normalen Salzsäurelösung zur Meßlösung addiert. Unmittelbar nach Erfassung der ersten Potentialänderungen durch das Probenerkennungssystem (21), das mit den Sensoren (15) und (16) über den Analog-Digital-Wandler (2) verbunden ist, wird der Meßzeitbeginn durch die in die Meßzeiteinrichtung (18) integrierte Zeitablaufsteuerung (19) ausgelöst. Nach Ablauf der programmierten Meßzeit wird der Meßvorgang — ebenfalls durch die Zeitablaufsteuerung (19) — abgebrochen. Die anfallenden Meßsignale gelangen danach in das Meßwertaufnahmesystem (23), von wo sie zur Berechnung des Korrekturfaktors durch die Vorrichtung zur Meßwertverarbeitung und Ergebnisbildung (24) abgerufen werden. Der hier ermittelte Korrekturfaktor wird zunächst im Zwischenspeicher (25) abgelegt. Nach der Bestimmung des Korrekturfaktors wird bei geschlossenem Ventil (9) und geöffnetem Ventil (13) die Meßzelle automatisch geleert und mit Meßlösung gefüllt, um den Grundzustand der Sensoren (15) und (16) wieder zu erreichen. Werden nach fünf Spülvorgängen die Ausgangspotentiale nicht erreicht, so wird wieder der Befehl "Sensorwechsel" erteilt und der Meßvorgang von Beginn an wiederholt. Bei Erreichen der Potentialgrundzustände wird als nächstes mit Hilfe der Kalibrier- und Meßvorgangssteuerung (22) das Meßsystem (1), genau genommen die Meßzelle (5) mit dem Biosensorsystem (7), mit einer definierten Penicillinkonzentration kalibriert. Dazu wird nach Befehlserteilung zunächst über die Dateneingabeeinheit (4) die Kalibrierkonzentration von Penicillin G der Steuer- und Auswerteeinheit (3) mitgeteilt, wo sie im Zwischenspeicher (25) abgelegt wird. Die darauf folgende Aufforderung zur Kalibrierprobendosierung wird durch Addition von 50 µl einer Kalibrierlösung, die ein  $1 \times 10^{-2}$  molarer Phosphatpuffer vom pH-Wert 7,0 mit 30 mM Penicillin G ist, zur Meßlösung in der Meßzelle (5) ausgeführt. Durch den Magnetrührer (6) wird die nun penicillinhaltige Meßlösung durchmischt, und das Penicillin G dringt in die Enzymmembran des Sensors (15) ein, wo auf Grund der biokatalytischen Reaktion das Penicillin G innerhalb der programmierten Meßzeit umgesetzt wird und damit eine pH-Änderung in der Enzymmem-

bran verursacht wird. Der zweite Meßsensor (16) übt beim Kalibriervorgang noch keine Funktion aus, da im allgemeinen davon auszugehen ist, daß Meßlösung und Kalibrierlösung den gleichen pH-Wert besitzen. In gleicher Weise wie bei der Bestimmung des Korrekturfaktors beschrieben, wird unmittelbar nach Erfassung erster Potentialänderungen am Sensor (15) durch das Probenerkennungssystem (21) der Meßbeginn gestartet und die Meßzeit auch beendet. Am Ende der Meßzeit liegt eine der Penicillinkonzentration entsprechende pH-Wertänderung bzw. eine dieser entsprechende Spannung an, die durch das Meßwertaufnahmesystem (23) aufgenommen und als Meßsignal für die Kalibrierkonzentration ebenfalls im Zwischenspeicher (25) abgelegt wird. Die nächsten automatischen Meßablaufschritte sind wie oben beschrieben wieder die Spülvorgänge zum Erlangen des Grundzustandes des Meßsensors (15), einschließlich des eventuell erforderlichen Befehls zum "Sensorwechsel" mit nachfolgender "Eingabe der Meßzeit" als erneuter Meßablaufbeginn mit neuem Biosensorsystem (7). Der Kalibriervorgang kann gleichzeitig verbunden werden mit der — wegen des unvermeidlichen Aktivitätsverlustes der Enzymschicht — notwendigen Bestimmung des Aktivitätszustandes des Sensors (15). Dazu wurde in einem der Kalibrier- und Meßvorgangssteuerung (22) folgendem Erkennungssystem (26) für den Aktivitätszustand des Sensors (15) ein Mindestwert der zu erreichenden Spannung für die Kalibrierkonzentration des Penicillins G eingegeben und abgespeichert. Wird dieser Spannungswert nach Zugabe der Kalibrierlösung zur Meßlösung nicht erreicht, so erfolgt als erstes der Befehl über die Meßvorrichtungsteile (27) oder (28) "Verdoppelung des Kalibrierlösungsvolumens". Das bedeutet, daß man mit 50 µl einer  $10^{-2}$  normalen Salzsäure und 100 µl Kalibrierlösungsvolumen den Meßablauf von "Eingabe der Meßzeit" an wiederholt. Wird auch dann der Wert für die vorgegebene Mindestspannung nicht erreicht, so erfolgt wieder der Befehl "Sensorwechsel".

Erst nach der beschriebenen Ermittlung des Korrekturfaktors und Kalibrierung des Meßsystems (1) ist die quantitative Bestimmung von Penicillin G in Fermentationslösungen möglich. Dazu werden auf den Befehl "Probendosierung" 50 µl (bei Kalibrierung mit 100 µl Kalibrierlösung 100 µl) Fermentationslösung zur Meßlösung dosiert, wobei bei der weiteren Beschreibung des Meßablaufes davon ausgegangen wird, daß der pH-Wert der Fermentationslösung von dem der Meßlösung abweicht. Durch den Sensor (15) wird nach der Probenzugabe zur gerührten Meßlösung die durch die biokatalytische Reaktion verursachte pH-Wert- bzw. Spannungsänderung und die pH-Wert- bzw. Spannungsdifferenz zwischen Meßlösung und Fermentationslösung in der gleichen Weise gemessen, wie es bei der Bestimmung des Korrekturfaktors und der Darstellung des Kalibriervorganges beschrieben wurde. Der Gesamtspannungswert vom Sensor (15) wird vom Meßwertaufnahmesystem (23) aufgenommen und danach im Zwischenspeicher (25) abgelegt. Gleichzeitig mit der Erfassung der Spannungssignale am Sensor (15) wird am Sensor (16) allein die pH-Wertdifferenz bzw. die ihr entsprechende Spannungsdifferenz zwischen Meßlösung und Fermentationslösung gemessen, die auch im Zwischenspeicher (25) abgelegt wird. Nach Abruf aus dem Zwischenspeicher (25) wird durch die Vorrichtung (24) die Differenz aus den Meßsignalen des Sensors (15) und des Sensors (16) gebildet, und dieser Wert wird ebenfalls im Zwischenspeicher (25) abgelegt.

Nach Beendigung des Meßvorganges mit der penicillinhaltigen Fermentationslösungsprobe werden wieder die oben beschriebenen Spülvorgänge zum Erlangen der Grundzustände der Meßsensoren (15) und (16) automatisch ausgeführt, wobei nachfolgend in Abhängigkeit von den angezeigten Befehlen entweder die nächste penicillinhaltige Fermentationsprobe vermessen wird oder wegen zu niedrigem Aktivitätszustand des Sensors (15) infolge Aktivitätsverlustes in der Enzymmembran bei zu langem Meßeinsatz neu kalibriert bzw. ein Sensorwechsel vorgenommen werden muß. Kürzere Meßunterbrechungen von größer als fünf Minuten werden durch die Meßablaufsteuerung (20) der Steuer- und Auswerteeinheit (3) automatisch mit der Überprüfung der Grundzustände der Meßsensoren (15) und (16) beantwortet und solche Meßunterbrechungen von mehr als sechzig Minuten grundsätzlich mit einem neuen Meßbeginn durch den Befehl "Eingabe der Meßzeit" mit den sich anschließenden, beschriebenen Meßabläufen.

Durch die Meßablaufsteuerung (20) wird auch nach einer über die Dateneingabeeinheit (4) programmierten und damit frei wählbaren Zeit, vorteilhafterweise aber nach 60 Minuten, der Befehl zur Neukalibrierung des Meßsystems (1) gegeben. Weiter gehört zum durch die Meßablaufsteuerung (20) gesteuerten Meßablaufprogramm, daß nach jedem über die Dateneingabeeinheit (4) vorzunehmenden Auslösen eines Meßvorganges die Meßzelle zunächst geleert und wieder mit Meßlösung gefüllt wird. Die Berechnung der in der Fermentationslösung enthaltenen Penicillinkonzentration wird durch die in die Steuer- und Auswerteeinheit (4) integrierte Vorrichtung zur Meßwertverarbeitung und Ergebnisbildung (24) übernommen, die dazu die im Zwischenspeicher (25) abgespeicherten Werte des Korrekturfaktors für das Biosensorsystem (7) und die Differenzwerte als Ergebnis der Probenmessungen abrufen. Der Wert des Korrekturfaktors und die Differenzwerte werden miteinander multipliziert, so daß Spannungswerte erhalten werden, die den wahren Penicillinkonzentrationen in der Fermentationslösung entsprechen. Gleichzeitig mit der Berechnung wird durch das Meßvorrichtungsteil (24) der Spannungswert für die Kalibrierkonzentration von 30 mM Penicillin G pro Liter Kalibrierpuffer aus dem Zwischenspeicher (25) abgerufen und im letzten Berechnungsschritt das Ergebnis der Konzentrationsbestimmung von Penicillin G in Fermentationslösungen durch einen Vergleich des gemessenen und korrigierten Spannungswertes mit dem Spannungswert für die bekannte Kalibrierkonzentration ermittelt. Dieses durch Vergleich erhaltene Meßergebnis wird zum Abschluß des Meßvorganges über das Anzeigegerät (27) digital oder über das Dokumentationsgerät (28), das ein Drucker oder Monitor sein kann, in Konzentrationseinheiten pro Volumeneinheit — aber auch nach entsprechender Kalibrierung oder Umrechnung in Aktivitätseinheiten pro Volumeneinheit — angezeigt bzw. ausgegeben. Mit der beschriebenen Meßvorrichtung wurden bei der Penicillinbestimmung folgende Leistungsparameter erreicht:

- Ansprechzeit des Biosensorsystems (7): 2 bis 5 Sekunden
- Meßzeit für eine Meßprobe einschließlich Eich- und Spülvorgänge: 15 bis 20 Sekunden
- Variationskoeffizient (20 Proben):  $\leq 2\%$
- Geradengleichung für den Methodenvergleich (Regressionsanalyse für 25 Proben):  $Y = (1,017 \pm 0,049) \times -(1,135 \pm 1,180)$



— Korrelationskoeffizient:  $r(xy) = 0,9911$ .

### Beispiel 2

Die erfindungsgemäße Meßvorrichtung wird benutzt zur Bestimmung von Harnstoff in Serum. Meßprinzip und Meßablauf entsprechen den in Beispiel 1 beschriebenen. Die pH-sensitive Oberfläche des Meßsensors (15) des Biosensorsystems (7) wurde mit Urease beschichtet, während der Meßsensor (16) auch in diesem Falle unbeschichtet bleibt. Als Meßlösung wird eine von der Dialyse mit der künstlichen Niere her bekannte Dialyselösung verwendet, deren pH-Wert 7,4 ist. Der Korrekturfaktor für das Biosensorsystem (7) wird mit einer 0,015 n Natronlauge bestimmt. Kalibriert wird das Meßsystem (1) mit einer 10 millimolaren Harnstoffkalibrierlösung. Folgende Leistungsparameter wurden bei der Harnstoffbestimmung erreicht:

- Ansprechzeit des Biosensorsystems (7): 10 bis 15 Sekunden
- Meßzeit für eine Meßprobe:  $\leq 30$  Sekunden

Die analytischen Parameter entsprechen denen des Beispiels 1.

### Beispiel 3

Die erfindungsgemäße Meßvorrichtung wird benutzt zur Bestimmung von Disacchariden in Gegenwart von Glukose. Bei der Saccharosebestimmung in Gegenwart von Glukose sieht das Biosensorsystem (7) wie nachfolgend beschrieben aus.

Die Meßsensoren (15) und (16) sind Sauerstoff oder seine Reduktionsprodukte messende Sensoren mit Referenzsensor (17) und mit entsprechenden, die Meßsignale bildenden, kommerziellen Bauteilen. Der Meßsensor (15) ist beschichtet mit einer Enzymmembran, die Saccharose (Invertase), Mutarotase und Glukoseoxidase enthält, der Sensor (16) hingegen ist nur mit einer Glukoseoxidase enthaltenden Membran, die gegebenenfalls noch Mutarotase enthalten kann, beschichtet. Als Meßlösung dient ein Phosphatpuffer (0,1 mol/l) vom pH-Wert im Bereich von 6 bis 7,5. Der Korrekturfaktor für das Biosensorsystem (7) wird mit einer Glukoselösung (10 mM) bestimmt und kalibriert wird mit einer Saccharoselösung (10 mM). Zur Ergebnisbildung wird die 1. Ableitung des Stromes nach der Zeit des Maximalwertes des Meßstromes als Meßsignal herangezogen. Innerhalb von 10 bis 15 Sekunden steht das Meßergebnis zur Verfügung, und die Gesamtmeßzeit für eine Meßprobe beträgt weniger als 30 Sekunden.

Biosensorsysteme (7) der Meßvorrichtung mit gleichen Leistungsparametern können zur Bestimmung anderer Disaccharide wie Laktose oder Maltose herangezogen werden, wenn die Enzymzusammensetzung des Sensors (15) verändert wird bei unverändertem Sensor (16). Zur Bestimmung von Laktose besteht die Enzymmembran des Meßsensors (15) aus den immobilisierten Enzymen  $\beta$ -Galaktosidase, Mutarotase und Glukoseoxidase und für die Maltosebestimmung aus den immobilisierten Enzymen Glukoamylase, Mutarotase und Glukoseoxidase, während der Meßsensor (16) wie beim Beispiel der Saccharosebestimmung aufgebaut ist.

Verwendete Bezugszeichen zur Fig. 1

1 = Meßsystem

- 2 = Analog-Digital-Wandler
- 3 = Steuer- und Auswerteeinheit
- 4 = Dateneingabeeinheit
- 5 = Meßzelle
- 6 = Rührer
- 7 = Biosensorsystem
- 8 = Meßzellenzuflußleitung
- 9 = Ventil
- 10 = Dosiervorrichtung
- 11 = Vorratsbehälter für die Meßlösung
- 12 = Meßzellenabflußleitung
- 13 = Ventil
- 14 = Absaugvorrichtung
- 15 = Sensor 1
- 16 = Sensor 2
- 17 = Referenzsensor
- 18 = Meßzeiteinrichtung
- 19 = Zeitablaufsteuerung
- 20 = Meßablaufsteuerung
- 21 = Probenerkennungssystem
- 22 = Kalibrier- und Meßvorgangssteuerung
- 23 = Meßwertaufnahmesystem
- 24 = Vorrichtung zur Meßwertverarbeitung und Ergebnisbildung
- 25 = Zwischenspeicher
- 26 = Erkennungssystem für Aktivitätszustand des Biosensorsystems (7)
- 27 = Anzeigegerät
- 28 = Dokumentationsgerät
- 29 = Stromversorgungssystem
- 30 = Gerätegehäuse
- = elektrische Leitungen
- ← = elektrische Leitungen

### Patentansprüche

1. Meßvorrichtung zur automatischen Bestimmung der Konzentration von Substraten von Biokatalysatoren mittels potentiometrischer und amperometrischer Enzymelektroden bzw. Biosensoren bekannter Bauart, dadurch gekennzeichnet, daß sie aus einem kalibrierenden rechnergestützten Differenzmeßsystem (1), verbunden über einen Analog-Digital-Wandler (2) und mit einer Steuer- und Auswerteeinheit (3), die eine quasi kontinuierliche, quantitative Auswertung potentiometrische und amperometrische Meßsignale in hoher Reproduzierbarkeit und unter Ausschaltung bzw. Minimierung der meßwertverfälschenden Störgrößen gewährleistet, besteht.

2. Meßvorrichtung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Steuer- und Auswerteeinheit (3) aus einer Meßzeiteinrichtung (18), einer Zeitablaufsteuerung (19), einer Meßablaufsteuerung (20), einem Probenerkennungssystem (21), einer Kalibrier- und Meßvorgangssteuerung (22), einem Meßwertaufnahmesystem (23), einer Vorrichtung zur Meßwertverarbeitung und Ergebnisbildung (24), einem Zwischenspeicher (25), einem Erkennungssystem für den Aktivitätszustand der Sensoren (26) und einem Stromversorgungssystem (29) besteht.

3. Meßvorrichtung nach Ansprüchen 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Meßzeiteinrichtung (18) so dimensioniert ist, daß die Meßzeiten frei wählbar, vorzugsweise von 2 bis 60 Sekunden eingestellt werden können.

4. Meßvorrichtung zur Bestimmung der Konzen-

tration von Substraten der Hydrolasen in Meßproben, vorzugsweise in Fermentationslösungen und Serum nach Ansprüchen 1–3, dadurch gekennzeichnet, daß das Biosensorsystem im rechnergesteuerten Maßsystem, aus einer pH-Elektrode oder einem pH-sensitiven, ionenselektiven Feldeffekttransistor, die mit Hydrolasen beschichtet sind, einer unbeschichteten pH-Elektrode oder einem unbeschichteten pH-sensitiven, ionenselektiven Feldeffekttransistor und einer gemeinsamen Referenzelektrode besteht und die Meßzeiteinrichtung auf eine Meßzeit von kleiner oder gleich 60 Sekunden eingestellt wird.

5. Meßvorrichtung zur Bestimmung von glukosehaltigen Disacchariden in Gegenwart von Glukose nach Ansprüchen 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß das Biosensorsystem (7) im rechnergesteuerten Meßsystem (1) aus einer Sauerstoffelektrode vom Typ der Clark-Elektroden oder einer gleiche Eigenschaften besitzenden und mit Mediatoren modifizierten Elektrode (15), die zur Glukosebildung mit einem Disaccharide spaltenden Enzym und zusätzlich mit Glukoseoxidase und gegebenenfalls Mutarotase beschichtet ist, einer Sauerstoffelektrode vom Typ der Clark-Elektrode oder eine gleiche Eigenschaften besitzende und mit Mediatoren modifizierte Elektrode (16), die mit Glukoseoxidase und gegebenenfalls mit Mutarotase beschichtet ist und einer Referenzelektrode (17) besteht und die Meßzeiteinrichtung (18) auf eine Meßzeit von kleiner oder gleich 30 Sekunden eingestellt ist.

6. Verfahren zur automatischen Bestimmung der Konzentration von Substraten von Biokatalysatoren mittels einer Meßvorrichtung mit einem Biosensorsystem, dessen Biosensoren mit immobilisierten Biokatalysatoren in eine gepufferte Meßlösung eintauchen, die zu bestimmenden Substrate in einer Probelösung definierter Menge dieser Meßlösung zugesetzt werden und die pH-Änderung oder Spannungsänderung pro Zeitintervall gemessen wird, dadurch gekennzeichnet, daß man die Meßlösung auf eine Pufferkonzentration von 2,0 bis  $10^{-5}$  mol/l und einem pH-Wert in der Nähe des pH-Optimums des jeweils immobilisierten Biokatalysators einstellt, die Meßzeit im Bereich von 2 bis 60 Sekunden festlegt, einen Korrekturfaktor ermittelt, eine Kalibrierung des Meßsystems durch eine Lösung definierter Mengen an zu bestimmenden Substraten von Biokatalysatoren durchführt und die Konzentrationswerte angezeigt oder ausgegeben werden.

7. Verfahren zur automatischen Bestimmung der Konzentration von Substraten von Biokatalysatoren mittels einer Meßvorrichtung mit einem Biosensorsystem, dessen Biosensoren mit immobilisierten Biokatalysatoren in eine gepufferte Meßlösung eintauchen, nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Meßlösung, die auf eine Pufferkonzentration von 2,0 bis  $10^{-5}$  mol/l mit einem pH-Wert in der Nähe des pH-Optimums des jeweils immobilisierten Biokatalysators eingestellt ist, aus einem Vorratsbehälter in eine Meßzelle gepumpt wird, der Vorgang zum Erreichen konstanter elektrischer Ausgangssignale der Sensoren gegebenenfalls bis zu fünfmal im Wechsel mit Leeren der Meßzelle wiederholt wird und gegebenenfalls bei nichtkonstanten Ausgangssignalen ein Sensorwechsel signalisiert wird, daß bei konstanten Aus-

gangssignalen die Meßzeit über eine Dateneingabeeinheit einer Meßzeiteinrichtung und einer Steuer- und Auswerteeinheit mitgeteilt wird, daß anschließend zur Bestimmung eines Korrekturfaktors für ein unterschiedliches Ansprechverhalten der Sensoren des Meßsystems die Lösung einer Störsubstanz zur Meßlösung zugegeben wird, die Meßlösung durchmischt wird und nach Erfassung der ersten Meßsignaländerungen an den Sensoren durch ein Probenerkennungssystem, das mit den Sensoren des Meßsystems über einen Analog-Digital-Wandler verbunden ist, der Meßzeitbeginn durch eine in die Meßzeiteinrichtung integrierte Zeitablaufsteuerung ausgelöst wird, nach Ablauf der programmierten Meßzeit der Meßvorgang ebenfalls durch die Zeitablaufsteuerung abgebrochen wird, die Meßsignale danach in ein Meßwertaufnahmesystem gelangen, ein Korrekturfaktor für das Sensorsystem berechnet und dieser in einem Zwischenspeicher abgelegt wird,

anschließend die Meßzelle geleert und erneut mit Meßlösung zur Herstellung der konstanten Grundzustände der Sensoren gefüllt wird, gegebenenfalls die Sensoren nach fünfmaligem Füllen und Leeren der Meßzelle infolge nichtkonstanter Grundzustände zum Wechseln angezeigt werden und der Meßvorgang von Beginn an wiederholt wird, daß bei Erreichen konstanter Grundzustände die Meßzelle zur Kalibrierung mit der Lösung definierter Mengen an zu bestimmenden Substraten der Biokatalysatoren zwischen 2 und 50 mmol Substrat pro Liter mit Meßlösung gefüllt wird, die Kalibrierwerte über die Dateneingabeeinheit der Steuer- und Auswerteeinheit mitgeteilt und im Zwischenspeicher abgelegt werden, daß nach Zudosierung der Kalibrierlösung die die Substrate der Biokatalysatoren enthaltende Meßlösung durchmischt wird, durch das Probenerkennungssystem der Meßbeginn gestartet und die Meßzeit auch beendet wird, die Meßsignale für die Kalibrierkonzentration durch das Meßwertaufnahmesystem aufgenommen und ebenfalls im Zwischenspeicher abgelegt werden,

daß anschließend die Grundzustände der Sensoren des Meßsystems durch bis zu fünfmaliges Spülen mit der Meßlösung, gegebenenfalls durch Sensorwechsel, wieder hergestellt werden, gegebenenfalls der Kalibriervorgang mit der Bestimmung des Aktivitätszustandes der Biosensoren des Meßsystems verbunden wird, wobei ein zu erreichender Mindestwert der elektrischen Meßsignale für die Kalibrierkonzentration der Kalibrierlösung, der ebenfalls im Zwischenspeicher abgespeichert ist, durch das Probenerkennungssystem mit dem gemessenen Signal für die Kalibrierkonzentration verglichen wird und bei Nichterreichen dieses Mindestwertes die Aufforderung zum Wechsel der Biosensoren des Meßsystems erfolgt, daß bei Vorliegen eines ausreichenden Aktivitätszustandes der Biosensoren dann die Probendosierung der zu bestimmenden Substrate der Biokatalysatoren zur Meßlösung erfolgt, diese durchmischt wird, die wie oben beschrieben erhaltenen Werte der elektrischen Meßsignale nach Probenzugabe für den ersten und zweiten Sensor vom Meßwertaufnahmesystem aufgenommen werden, durch eine Vorrichtung zur Meßwertverarbeitung und Ergebnisbildung daraus die Differenz aus den Meßsignalen vom ersten Sen-



sor und zweiten Sensor gebildet wird und dieser Differenzwert aus den Meßsignalen beider Sensoren im Zwischenspeicher abgelegt wird, daß danach die Berechnung der Konzentration der Substrate der Biokatalysatoren in der Meßlösung erfolgt, indem durch die in die Steuer- und Auswerteeinheit integrierte Vorrichtung zur Meßwertverarbeitung und Ergebnisbildung aus dem Zwischenspeicher die Werte für die Korrekturfaktoren und die Differenzwerte als Ergebnis der Probenmessungen abgerufen werden, beide Werte miteinander multipliziert werden, diese den zu bestimmten Konzentrationen der Substrate der Biokatalysatoren entsprechenden, korrigierten Meßsignalwerte mit den Meßsignalwerten für die Kalibrierkonzentrationen verglichen werden und daß die auf diese Weise ermittelten Konzentrationswerte für die Substrate von Biokatalysatoren in Probelösungen über ein Anzeigegerät digital oder über ein Dokumentationsgerät in Konzentrationseinheiten pro Volumeneinheit, gegebenenfalls nach entsprechender Eichung auch in Aktivitätseinheiten pro Volumeneinheit oder Mengeneinheit, angezeigt beziehungsweise ausgegeben werden.

8. Verfahren nach den Ansprüchen 6 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß zur Herstellung der Kalibrierlösungen die definierten Konzentrationen der Substrate der Biokatalysatoren zur Kalibrierung des Meßsystems in Kalibrierpuffern oder Kalibrierlösungen mit einer Pufferkapazität aufgelöst werden, die sich aus den durch Titration bestimmten Mittelwerten der unterschiedlichen Pufferkapazitäten der zu vermessenden Proben mit den unbekannten Konzentrationen der Substrate der Biokatalysatoren ergibt.

---

Hierzu 1 Seite(n) Zeichnungen

---

40

45

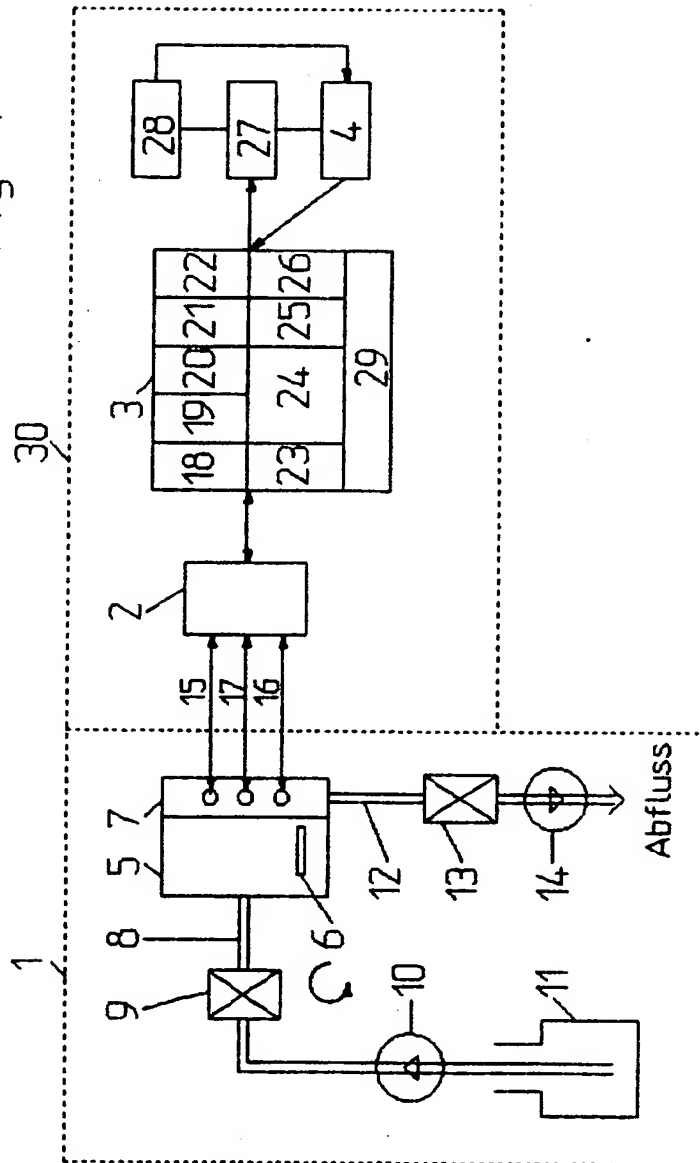
50

55

60

65

Fig 1



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

### **IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**

**This Page Blank (uspto)**